

基于荧光光谱技术的异槲皮素抑制晚期糖基化产物形成的机制研究

张露¹, 徐亮¹, 涂宗财^{1, 2*}, 周祺溟¹, 周雯娜¹

1. 江西师范大学生命科学学院, 国家淡水鱼加工技术研发专业中心, 江西省淡水鱼高值化利用工程技术研究中心, 江西 南昌 330022
2. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047

摘要 荧光光谱学具有灵敏度高、选择性强、样品用量少、操作简便的优点, 同时又可提供多种分子间相互作用的物理参数, 所以被广泛用于研究小分子和蛋白质的相互作用。因此, 通过内源荧光、同步荧光以及三维荧光光谱技术, 研究异槲皮素抑制 α -乳白蛋白(α -lactalbumin, α -La)-果糖体系糖基化过程中晚期糖基化产物(AGEs)形成的能力, 并从分子间相互作用的角度阐述其作用机制, 最终阐明异槲皮素抑制食品热加工过程中 AGEs 形成的能力。结果表明, 异槲皮素可显著降低糖基化反应诱导的 α -La 构象变化, 抑制 AGEs 的形成, 样品浓度为 $36.58 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其抑制率达 74.66%, 高于阳性对照组氨基胍盐酸盐。同步荧光和三维荧光光谱分析结果表明, 异槲皮素会改变 α -La 的构象, 使色氨酸暴露于更亲水的环境中, 增加其微环境的亲水性。抑制动力学和热力学分析结果显示, 异槲皮素通过静态方式猝灭 α -La 的内源荧光, 且与 α -La 按照 1:1 的摩尔比例结合形成了稳定的复合物, 该结合是一个自发放热的过程, 范德华力和氢键是异槲皮素- α -La 复合物形成的主要作用力。

关键词 异槲皮素; α -乳白蛋白; 糖基化; 荧光光谱; 分子间相互作用

中图分类号: O433.4 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)12-3755-06

引言

糖基化反应, 又叫美拉德反应, 是还原糖的醛基和蛋白质、核苷酸和脂质的氨基之间发生的一种自发的非酶促反应^[1], 通常包括初期、中期和晚期三个阶段, 最后会形成一系列晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)。在食品加工工业, 常通过糖基化反应提高蛋白质的功能特性(如起泡性、乳化性、抗氧化性等), 改善食品的风味、色泽和口感^[2-3]。但食品体系或食品蛋白在糖基化过程中也会形成对人体有害的 AGEs, 降低氨基酸的营养价值^[4]。研究发现, 坚果、谷类产品、高温加工的罐头产品、烤肉、饼干和蛋糕通常含有相对较高的 AGEs^[1]。长期摄入富含 AGEs 的食物, 会导致 AGEs 在机体中的积累, 加速血管中胶原蛋白的交联, 促进活性氧和活性碳自由基的形成, 增强胰岛素抵抗, 促进促炎症反应等, 从而增加阿尔茨海默病、糖尿病、炎症、心血管疾病、视网膜病变等系列慢性疾病的发病率^[5]。添加 AGEs 抑制剂降低食品在热加工过程中

AGEs 的形成是提高食品安全, 促进人体健康的有效方法之一。

AGEs 抑制剂包括合成和天然化合物两类, 其中植物来源的天然 AGEs 抑制剂因其种类多、效果较好、副作用小等优点已成为国内外的研究热点^[6]。Oral 等^[7]研究发现, 石榴皮提取物、欧洲布什蔓越莓汁提取物、咖啡酸、儿茶素、鞣花单宁等植物提取物和多酚类化合物可有效降低饼干烘烤过程中呋喃和丙烯酰胺的形成; 添加 0.2% 的白藜芦醇、表儿茶素和迷迭香酸, 可使饼干中荧光性 AGEs 的形成量降低 28.60%~62.05%^[8]。异槲皮素(槲皮素-3-O-葡萄糖苷)是普遍存在于植物中的功能性次级代谢产物, 具有降血压、抗氧化、保肝、抗增殖、抗利尿、抗癌等多种生物活性^[9], 前期研究发现, 槲皮素能有效抑制 BSA-葡萄糖体系在 37 °C 条件下的糖基化反应, 降低 AGEs 的形成, 但糖苷形式的槲皮素——异槲皮素, 能否有效抑制食品蛋白在热处理条件下的糖基化反应需进一步研究。

近年来, 荧光光谱法因其具有灵敏度高、选择性强、样品用量少、操作简便, 同时又可以提供较多的物理参数的特

收稿日期: 2019-11-01, 修订日期: 2020-03-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860475), 江西省青年重点项目(20192ACB21011), 江西省科技计划项目(20171BEG71028)资助

作者简介: 张露, 1987年生, 江西师范大学生命科学学院讲师 e-mail: zhanglu00104@163.com

* 通讯联系人 e-mail: tuzc_mail@aliyun.com

点, 广泛应用于小分子和蛋白质的相互作用研究。因此本文以 α -La-果糖体系为研究模型, 通过分析荧光性 AGEs 相对含量的变化, 研究热处理条件下, 异槲皮素对 α -La-果糖体系糖基化反应的影响, 然后通过内源荧光、同步荧光和三维荧光光谱技术研究异槲皮素对 α -La 的构象结构、微环境的影响及其相互作用机制, 最后从 α -La 结构变化和分子间相互作用的角度探讨异槲皮素抑制 α -La 糖基化的机制。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

果糖、异槲皮素(北京索莱宝科技有限公司); NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); α -La(美国 Sigma 公司)。

F-7000 荧光光谱仪(日本日立公司); 天平 FA1104N 电子分析天平(丙林电子科技有限公司); PE28 PH 计(梅特勒-托力多仪器(上海)有限公司)。

1.2 糖基化 α -La 制备

根据文献[10]报道方法制备糖基化体系。采用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)配制 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 α -La 和果糖溶液。 α -La 和果糖溶液按等体积比加入带盖玻璃瓶中, 然后分别加入不同浓度的异槲皮素溶液, 使反应体系中异槲皮素的浓度分别为 12.20, 24.39, 36.58, 48.78 和 $73.17 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用乙醇代替异槲皮素和用 PBS 代替果糖的反应体系分别设为控制组和样品空白组。最后, 所有混合体系于 55°C 下反应 36 h, 4°C 冷却后, 测定其荧光性 AGEs 的相对含量。

1.3 荧光光谱分析

1.3.1 AGEs 抑制活性测定

采用日立 F-7000 荧光光谱仪测定样品中荧光性 AGEs 的相对含量^[10]。样品用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.4 的 PBS 稀释 6 倍后测定其在激发波长 370 nm, 发射波长 440 nm 处的荧光强度, 激发和发射波长的狭缝宽度均设为 2.5 nm, 扫描速度为 $1200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。AGEs 抑制率的计算公式为

$$\text{抑制率} = \frac{(FI_c - FI_b) - (FI_s - FI_{nb})}{FI_c - FI_b} \times 100\% \quad (1)$$

其中 FI_s 为含有 α -La、果糖和异槲皮素的反应体系的荧光强度; FI_c , FI_b 和 FI_{nb} 分别为控制组、空白组和样品空白组的荧光强度。

1.3.2 内源荧光光谱

采用日立 F-7000 荧光光谱仪测定 α -La 内源荧光光谱的变化^[11], 扫描参数为: 激发波长, 280 nm; 发射波长, 300~400 nm; 激发和发射波长的狭缝宽度, 5.0 nm; 扫描速度, $1200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。测定前用 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.4 的 PBS 将所有样品稀释 30 倍。

1.3.3 同步荧光光谱

采用日立 F-7000 荧光光谱仪分析 298 K 条件下不同浓度异槲皮素对 α -La 同步荧光光谱的影响。波长间隔($\Delta\lambda$)为 15 nm 时的扫描范围为 260~350 nm, $\Delta\lambda$ 为 60 nm 时的扫描范围为 250~350 nm, 激发和发射波长的狭缝宽度均为 5

nm, 扫描速度为 $1200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, α -La 的浓度为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 异槲皮素的浓度范围为 $0.0 \sim 25.97 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3.4 三维荧光光谱

根据前期研究方法^[12], $2.0 \text{ mL } 0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 α -La 与 $10 \mu\text{L } 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的异槲皮素在 25°C 下混匀后, 静置 5 min, 然后测定其在激发和发射波长扫描范围均为 200~600 nm 时的荧光光谱, 激发和发射波长的狭缝宽度均为 5.0 nm, 扫描速率为 $12000 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.3.5 抑制动力学研究

采用荧光滴定的方法^[13], 分别测定 298, 304 和 310 K 时, 不同浓度异槲皮素对 α -La 在 300~400 nm 范围内的荧光发射光谱的影响。激发波长为 280 nm, 激发和发射狭缝宽度为 5.0 nm, 扫描速度为 $1200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。混合体系中, α -La 的浓度为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 异槲皮素的浓度从 $3.32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $25.97 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2 结果与讨论

2.1 AGEs 抑制能力分析

蛋白糖基化过程中形成的 AGEs 包括荧光性 AGEs 和非荧光性 AGEs 组成, 因此, 很多研究者采用荧光光谱技术评价样品抑制蛋白糖基化过程中 AGEs 形成的能力, 荧光强度越高, 表明反应体系中 AGEs 形成的相对含量越高, 抑制率就越低。异槲皮素对 α -La-果糖体系中 AGEs 形成的影响如图 1 所示, 当异槲皮素的浓度为 12.20, 24.39, 36.58, 48.78 和 $73.17 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其对 AGEs 形成的抑制率分别为 11.97%, 54.79%, 74.66%, 78.90% 和 86.25%, 而阳性对照品氨基胍盐酸盐在浓度为 24.39 和 $36.58 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 AGEs 形成的抑制率为 38.21% 和 58.72%, 低于异槲皮素, 表明异槲皮素能有效抑制 α -La 糖基化过程中 AGEs 的形成。

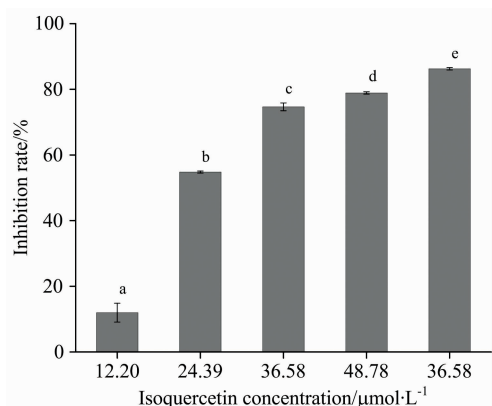


图 1 异槲皮素对 α -La-果糖体系中 AGEs 形成的影响
Fig. 1 Inhibitory activity of isoquercetin on the formation of AGEs on α -La-fructose system

2.2 内源荧光光谱分析

异槲皮素对糖基化 α -La 内源荧光强度的影响如图 2 所示。天然 α -La 具有最大荧光强度, 糖基化后 α -La 的荧光从

3 386 降低至 2 357。说明糖基化反应能显著降低了 α -La 的内源荧光, 可诱导蛋白构象的展开, 降低其内源荧光强度^[14]。但随着异槲皮素浓度从 $12.20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $48.78 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 糖基化 α -La 的内源荧光强度也逐渐增强, 说明异槲皮素能够降低糖基化反应诱导的 α -La 构象变化, 这可能是其抑制 AGEs 形成的原因之一。Zhang 等也表明, 缓解糖基化诱导的蛋白构象变化是天然提取物^[10] 和黄酮类化合物^[11] 抑制蛋白糖基化的机制之一。但当样品浓度为 $73.17 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 最大荧光强度值出现下降, 这可能是因为黄酮类化合物本身可与蛋白发生相互作用, 猝灭其内源荧光。当黄酮的相对浓度过高的时候, α -La 的糖基化反应被完全抑制, 反应体系中多余的黄酮类化合物进一步猝灭蛋白质的荧光, 改变其构象。

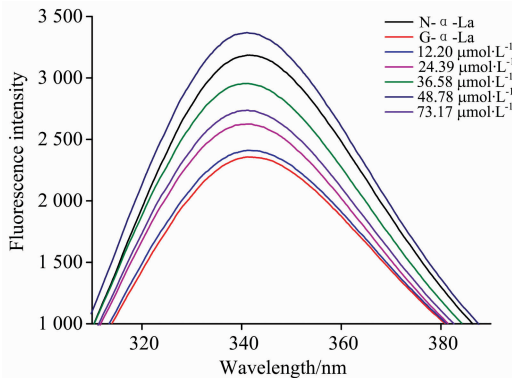


图 2 不同浓度异槲皮素对糖基化 α -La 内源荧光光谱
Fig. 2 Influence of isoquercetin on the intrinsic fluorescence spectra of glycosylated α -La

2.3 同步荧光光谱分析

同步荧光光谱可以检测蛋白质的主要荧光性发色团苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸, 激发波长为 280 nm 时, 蛋白质的荧光强度主要来源于色氨酸, 其次为酪氨酸, 因此, 可以通过同步荧光光谱技术分析异槲皮素对 α -La 中荧光性氨基酸残基附近微环境变化的影响。如图 3 所示, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 时的最大荧光发射光谱的变化分别反应酪氨酸和色氨酸微环境的变化。酪氨酸[图 3(a)]和色氨酸[图 3(b)]残基的最大荧光强度均随着异槲皮素浓度的增加而明显降低, 其中对色氨酸的荧光猝灭效果明显高于酪氨酸, 其荧光强度分别从 1 213 和 6 925 降至 827.4 和 3 700。另外, 色氨酸的最大发射波长出现了红移现象, 而酪氨酸的最大发射波长没有明显的变化。以上结果表明, α -La 的荧光猝灭的主要贡献者是色氨酸, 异槲皮素与 α -La 的结合会改变色氨酸微环境的极性, 使其暴露在更加亲水的环境中, 增加其周围微环境的亲水性^[13]。这可能是因为色氨酸比酪氨酸对其周围极性的变化更敏感, 如芹菜素、柚皮素、山柰酚和染料木素与 β -乳球蛋白的相互作用使色氨酸的荧光发射波长发生红移, 但是对酪氨酸的最大发射波长无影响^[15]。

2.4 三维荧光光谱分析

三维荧光光谱技术可以研究蛋白质的构象变化。异槲皮素对天然 α -La 的三维荧光光谱的影响如图 4 所示, Rayleigh

($E_x = E_m$) 峰是瑞利散射峰, 峰 1 ($E_x = 280 \text{ nm}$, $E_m = 330 \text{ nm}$) 为色氨酸残基的分光特性峰, 主要表明蛋白质的多肽骨架结构的变化。从图 4(a) 和 (b) 可以看出, α -La 与异槲皮素相互作用后, Rayleigh 峰和峰 1 的荧光强度显著降低, 这可能归因于色氨酸荧光团微环境的变化以及 α -La 内多肽骨架结构的变化^[13]。

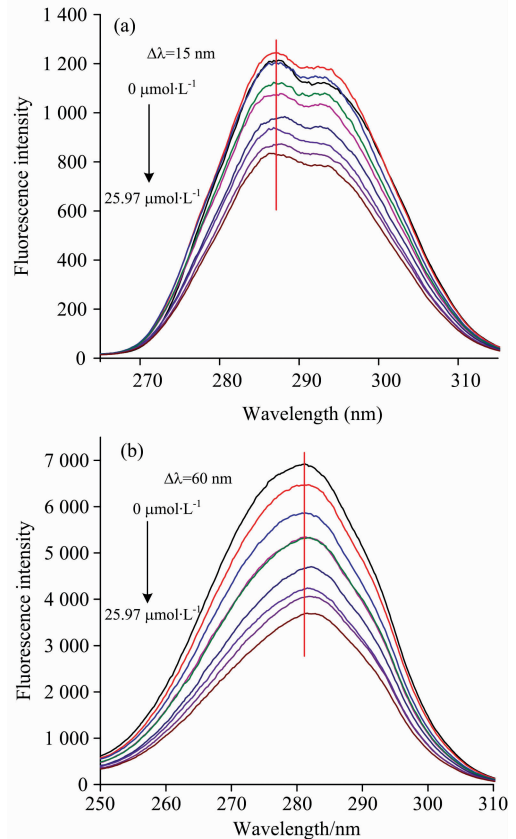


图 3 α -La 与不同浓度异槲皮素作用的同步荧光光谱
Fig. 3 Synchronous fluorescence spectra of α -La with different concentrations of isoquercetin with $\Delta\lambda$ fixed at 15 nm (a) and 60 nm (b), respectively

2.5 抑制动力学分析

2.5.1 荧光猝灭动力学

荧光光谱是研究小分子配体和蛋白受体间相互作用的强有力的工具, 已广泛被用于研究生物大分子和小分子间的相互作用机制^[13, 15]。由图 5(a) 所示, α -La 的荧光强度随异槲皮素浓度的增加逐渐降低, 且发射波长出现了明显的蓝移, 表明异槲皮素改变了 α -La 的构象结构, 有效猝灭了 α -La 的内源荧光, 其荧光猝灭机制可通过 Stern-Volmer 方程计算

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (2)$$

式(2)中, F 和 F_0 分别为含和不含异槲皮素时 α -La 的荧光强度; $[Q]$ 是异槲皮素的浓度; K_q 为荧光猝灭速率常数; K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常数; τ_0 为没有猝灭剂的情况下 α -La 的平均荧光寿命。

以异槲皮素浓度 $[Q]$ 为横坐标, F_0/F 为纵坐标绘制的

Stern-Volmer 曲线如图 5(b) 所示, 根据方程计算的 K_{SV} 和 K_q 如表 1 所示, K_{SV} 随着反应温度的升高而降低, K_q 在 298, 304 和 310 K 时的值分别为 6.07×10^{12} , 5.33×10^{12} 和

$5.14 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 且远高于生物大分子最大扩散碰撞猝灭常数 ($2 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), 表明异槲皮素是通过静态方式猝灭 α -La 的内源荧光^[16]。

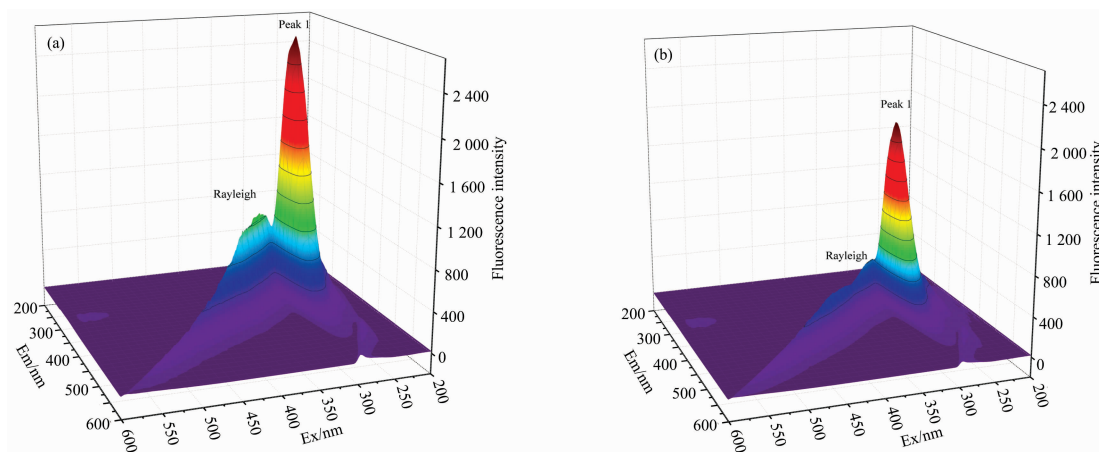


图 4 异槲皮素对 α -La 三维荧光光谱的影响

Fig. 4 Three-dimensional fluorescence spectra of α -La without (a) and with (b) isoquercetin

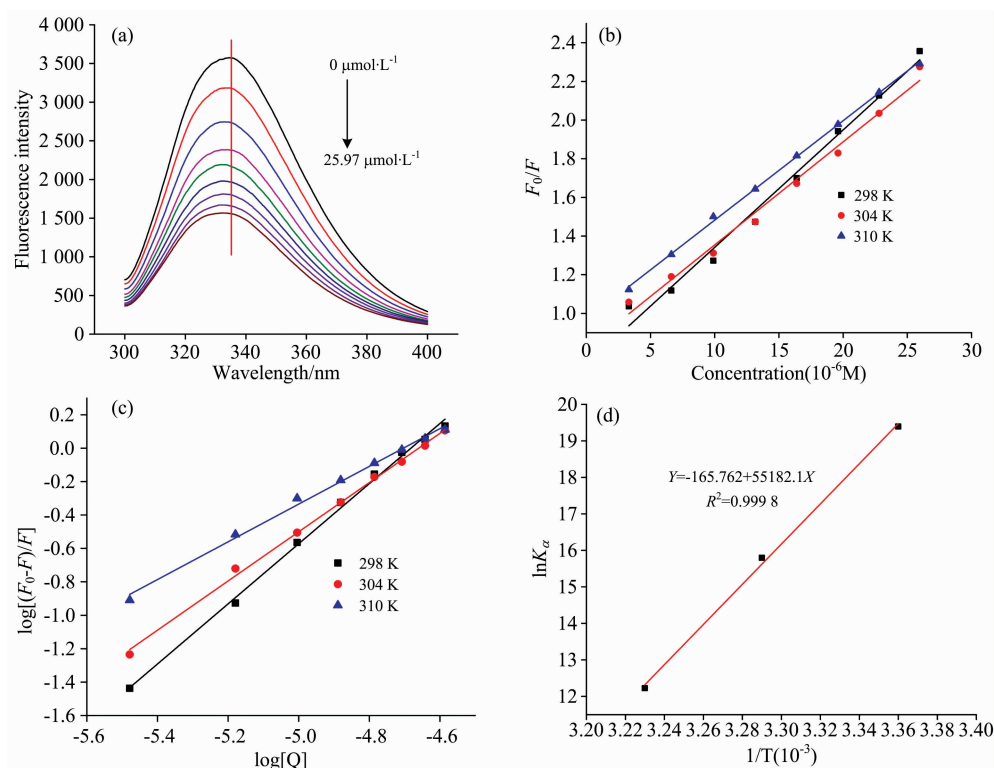


图 5 (a) 不同浓度异槲皮素对 α -La 荧光发射光谱的影响; (b) F_0/F 与异槲皮素浓度 $[Q]$ 之间的 Stern-Volmer 图; (c) $\log[(F_0 - F)/F]$ 与 $\log[Q]$ 的 double logarithmic 图; (d) $\ln K_a$ 与 $1/T$ 的 van't Hoff 图

Fig. 5 (a) Influence of isoquercetin on the fluorescence emission spectra of α -La; (b) The Stern-Volmer plots of F_0/F versus isoquercetin concentrations $[Q]$; (c) The double logarithmic plots of $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log[Q]$; (d) The linear plot of $\ln K_a$ versus $1/T$

2.5.2 结合常数和热力学参数

基于静态猝灭机理, 可采用 double logarithmic 方程(3) 计算结合常数 K_a 和结合位点数 n

$$\log\left[\frac{(F_0 - F)}{F}\right] = \log K_a + n \log[Q] \quad (3)$$

结合常数 K_a 和结合位点 n 如表 1 所示, 异槲皮素和 α -La 的 K_a 值随温度升高逐渐减小, 并且与 K_{SV} 的变化一致,

说明随温度的升高, 异槲皮素- α -La 复合物的稳定性降低, 说明异槲皮素与 α -La 的结合是一个放热的过程。结合位点数 n 分别为 1.368, 1.472, 1.128, 接近于 1。说明异槲皮素在 α -La 上是只有一个或者一类结合位点的^[13]。

用 van't Hoff 方程计算热力学参数中的焓变(ΔH°), 熵变(ΔS°)和自由能变化(ΔG°)来研究异槲皮素- α -La 复合物的形成过程中的热力学变化, 即

$$\ln K_a = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (4)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (5)$$

其中 R 是气体常数($8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T 是实验温度(288, 298 和 310 K), K_a 是通过式(2)得到的结合常数。根

据方程(4)绘制以 $\ln K_a$ 为纵坐标, 以 $1/T$ 为横坐标的直线[图 5(d)], 得到的 ΔH° , ΔS° 和 ΔG° 如表 1 所示。根据文献报道, $\Delta H^\circ < 0$, $\Delta S^\circ < 0$ 表明氢键和范德华力是分子间的主要作用力; $\Delta H^\circ > 0$, $\Delta S^\circ > 0$ 表明疏水相互作用是分子间的主要作用力; $\Delta H^\circ > 0$, $\Delta S^\circ < 0$ 表明静电相互作用是分子间的主要作用力^[15]。异槲皮素与 α -La 相互作用的 ΔH° 和 ΔS° 分别为 -458.79 和 $-1.39 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 均小于 0, 且 $|\Delta H^\circ| < |T\Delta S^\circ|$, 这进一步验证了异槲皮素与 α -La 的结合是一个放热的过程, 范德华力和氢键是其主要驱动力。另外, $\Delta G^\circ < 0$, 表明异槲皮素- α -La 复合物的形成是一个自发的过程^[16]。

表 1 槲皮素与 α -La 相互作用的荧光猝灭常数、结合位点数、结合常数和热力学参数

Table 1 The fluorescence quenching constants, binding sites, binding constant and thermodynamic parameters for the interaction of isoquercetin with α -La

T/K	$K_{sv}/(10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q/(10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	n	$K_a/(10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta H^\circ/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S^\circ/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	R	$\Delta G^\circ/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
298	6.07	6.07	1.299	264.70				-48.11
304	5.33	5.33	1.472	7.25	-458.79	-1.39	0.999 9	-39.84
310	5.14	5.14	1.128	0.21				-31.57

3 结 论

通过荧光光谱技术研究了异槲皮素抑制 α -La-果糖模型中 AGEs 形成的能力。研究表明, 异槲皮素可以显著抑制 α -La 糖基化过程中 AGEs 的形成, 减弱糖基化反应诱导的 α -La 构象变化。同时, 异槲皮素与 α -La 的相互作用会显著猝灭 α -La 的内源荧光, 改变 α -La 的构象, 使色氨酸暴露

在更加亲水的环境中, 增加其微环境的极性。分子间相互作用研究发现, 异槲皮素与 α -La 作用后按照 1:1 的摩尔比结合形成了稳定的复合物, 且通过静态的方式猝灭 α -La 荧光团; 异槲皮素- α -La 复合物的形成是一个自发的放热过程, 范德华力和氢键是其主要作用力。本研究结果证明, 异槲皮素可作为天然的糖基化抑制剂用于食品加工工业, 减少食品热加工过程中 AGEs 的产生, 提高食品的营养品质和安全性。

References

- [1] Cooke J. Journal of Renal Nutrition, 2017, 27(4): E23.
- [2] Liu J, Tu Z-C, Zhang L, et al. Food Sci. Technol. Res., 2018, 24(1): 35.
- [3] Yang W, Tu Z, Wang H, et al. J. Sci. Food Agric., 2018, 98(10): 3767.
- [4] Rannou C, Laroque D, Renault E, et al. Food Research International, 2016, 90: 154.
- [5] Ahmed N, Thornalley P J. Diabetes Obesity & Metabolism, 2007, 9(3): 233.
- [6] Yeh W J, Hsia S M, Lee W H, et al. Journal of Food & Drug Analysis, 2017, 25(1): 84.
- [7] Oral R A, Dogan M, Sarioglu K. Food Chemistry, 2014, 142(1): 423.
- [8] Ou J, Teng J, El-Nezami H S, et al. Journal of Functional Foods, 2018, 40: 44.
- [9] Valentová K, Vrba J, Bancířová M, et al. Food & Chemical Toxicology, 2014, 68: 267.
- [10] Zhang L, Zhang C-J, Tu Z-C, et al. Journal of Functional Foods, 2018, 42: 254.
- [11] Zhang L, Lu Y, Ye Y H, et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(1): 236.
- [12] Cheng J, Liu J H, Prasanna G, et al. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105(1): 965.
- [13] CAO Tuan-wu, HUANG Wen-bing, SHI Jian-wei, et al(曹团武, 黄文兵, 时建伟, 等). China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志), 2018, 43(5): 993.
- [14] WANG A-mei, TU Zong-cai, WANG Hui, et al(王阿美, 涂宗财, 王 辉, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2018, 38(10): 3090.
- [15] Li T, Hu P, Dai T, et al. Spectrochimica Acta Part A: Molecular & Biomolecular Spectroscopy, 2018, 201: 197.
- [16] Xie L, Wehling R L, Ciftci O, et al. Food Research International, 2017, 102: 195.

Mechanism of Isoquercitrin Inhibiting Advanced Glycation Products Formation Based on Fluorescence Spectroscopy Technique

ZHANG Lu¹, XU Liang¹, TU Zong-cai^{1, 2*}, ZHOU Qi-ming¹, ZHOU Wen-na¹

1. College of Life Science, National R&D Center for Freshwater Fish Processing, and Engineering Research Center of Freshwater Fish High-value Utilization of Jiangxi Province, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China

Abstract Fluorescence spectroscopy has the advantages of high sensitivity, strong selectivity, small sample amount, simple operation, and can provide a variety of physical parameters of intermolecular interaction. So it is widely used to study the interaction between small molecules and proteins. To elucidate the potential of isoquercetin suppressing the formation of (advanced glycation end products, AGEs) during thermal processing of high-protein foods, intrinsic fluorescence, synchronous fluorescence and three-dimensional fluorescence spectroscopic techniques were employed to evaluate the inhibition through α -lactalbumin (α -La)-fructose model, and the mechanism was elucidated from the perspective of intermolecular interactions. The results showed that isoquercetin significantly decreased the conformational change of α -La induced by glycosylation, resulting in the inhibition on AGEs formation. The inhibition rate reached up to 74.66% when the sample concentration was at $36.58 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. As revealed by synchronous and three-dimensional fluorescence spectroscopy, isoquercetin could change the conformation of α -La, promote the exposure of tryptophan to a more hydrophilic environment, and increased the hydrophilicity of its micro-environment. Inhibition kinetics and thermodynamic analysis showed that isoquercetin quenched the intrinsic fluorescence of α -La by static mechanism, and bound with α -La in a molar ratio of 1 : 1 to form a stable complex. The formation of isoquercetin- α -La complexes is a spontaneous and endothermic progressing, van der Waals forces and hydrogen bonds are the main driving forces.

Keywords Isoquercetin; α -Lactalbumin; Glycation; Fluorescence spectroscopy; Intermolecular interaction

(Received Nov. 1, 2019; accepted Mar. 7, 2020)

* Corresponding author